

氏 名	長 蔭 大 海
学位（専攻分野の名称）	博 士（バイオサイエンス）
学 位 記 番 号	甲 第 764 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 20 日
学 位 論 文 題 目	<b>光遺伝学的手法を用いた想起後の恐怖記憶エンGRAM制御に対する海馬の役割の解析</b>
論 文 審 査 委 員	主査 教 授・博士（農学） 喜 田 聡 教 授・農 学 博 士 河 野 友 宏 教 授・博士（農学） 小 川 英 彦 博士（医学），博士（農学） 小 林 和 人*

## 論 文 内 容 の 要 旨

心的外傷後ストレス障害（Post-traumatic stress disorder; PTSD）は恐怖体験，すなわち，恐怖記憶を原因とする精神疾患である。PTSD に対する有効な治療方法は認知行動療法「エクスポージャー（Prolonged exposure; PE）療法」であり，この治療方法の生物学的基盤は記憶想起後に誘導され，恐怖記憶減弱を導く「記憶消去」である。現在，恐怖記憶制御機構に基づいて PE 療法の短縮が試みられている。

本来，恐怖記憶はヒトを含めた動物の危険回避のための本能的記憶である。現在，世界的に用いられている恐怖記憶モデルは，げっ歯類の恐怖条件付け文脈記憶課題であり，小箱内（文脈；条件刺激）で電気ショック（恐怖；非条件刺激）を与えることで，文脈と恐怖の関連づけが記憶される。恐怖記憶は転写因子 cAMP responsive element binding protein（CREB）による遺伝子発現を必要とする固定化を経て長期記憶となって保存される。その後，電気ショックを受けた小箱に戻ると恐怖記憶が想起される。箱に短時間戻した場合には，恐怖記憶を維持あるいは増強する「再固定化」が誘導され，一方，長時間（30 分間）戻した場合には，電気ショックが与えられないことを再学習し，恐怖反応が減弱する「消去」が誘導されることが所属研究室において明らかにされている。このように，記憶を想起した時間の長さに応じて，短時間では再固定化，長時間では消去が誘導され，恐怖記憶がアップデートされる。重要な点として，記憶中枢である海馬では，再固定化時には CREB を介する転写が誘導されるのに対して，想起が長くなり消去が誘導されるとこの転写活性化は中止される。このように，再固定化と消去とでは海馬が対照的な生化学的変化を示し，想起後の恐怖記憶制御に対する海馬活性制御の重要性が示唆されている（Mamiya et al., 2009）。

記憶エンGRAMは学習によって活性化され，記憶情報を貯蔵する細胞集団であり，記憶貯蔵の実態と定義される。近年，学習時に活性化された細胞集団を人為的に再活性化することで記憶エンGRAMの同定が進んでいる。一方，光遺伝学的手法を用いれば，神経細胞に光感

\*福島県立医科大学 医学部付属生体情報伝達研究所生体機能研究部門 教授

受性タンパク質 [チャネルロドプシン 2 (ChR2) あるいはアーチロドプシン T (ArchT) など] を発現させて、光照射により神経細胞の機能をミリ秒単位で人為的に制御し、生理的な活性変動を再現することができる。

以上の背景から、本研究では、海馬の活性調節が想起後に再固定化あるいは消去を導く鍵プロセスではないかと考察した。この仮説を検証することを目的として、光遺伝学的手法を用いて海馬神経細胞及び記憶エンGRAM細胞を人為的に制御することで、想起後の恐怖記憶制御に対する海馬の役割を解析した。

## 1. 海馬光活性化による想起後の恐怖記憶に対する海馬の役割の解析

消去時に観察される海馬における遺伝子発現不活性化機構を解析し、光遺伝学的手法を用いて恐怖記憶消去に対する海馬と海馬記憶エンGRAMの役割を解析した。

### 1-1. 消去時の海馬における転写抑制機構の解析（転写抑制マーカーの同定）

海馬では、長時間の想起により消去を誘導させると、再固定化時に観察される CREB による転写活性化は誘導されなくなる。しかし、想起時間の長期化による消去誘導時の海馬における転写抑制機構は不明であるため、ヒストンの翻訳後修飾によるクロマチンリモデリングの観点からこの転写抑制機構を解析した。

本研究では、転写抑制マーカーであるヒストン H3 の 9 番目リジンのトリメチル化 (H3K9me3) に着目し、この修飾を認識する抗 H3K9me3 抗体を用いた免疫組織化学染色法により、恐怖条件付け文脈記憶の再固定化および消去時の H3K9me3 陽性細胞数を解析した。マウスをチャンバーに入れ、148 秒後に 0.4 mA、2 秒間の電気ショックを与え、恐怖記憶を形成させた（トレーニング）。トレーニングの 24 時間後に、3 あるいは 30 分間チャンバーにマウスを戻して恐怖記憶を想起させて（再エクスポージャー）、これを Shock +/Re 群とした。対照群として、再エクスポージャーを行わずに恐怖記憶を想起させなかった群 (Shock +/No Re 群)、トレーニング時に電気ショックを与えず恐怖記憶を形成させず、その後、再エクスポージャーを行った、あるいは、行わなかった群 (Shock -/Re 群, Shock -/No Re 群) をそれぞれ設けた。その結果、海馬 CA1 領域では、消去を誘導する 30 分間の再エクスポージャー後に、Shock +/Re 群では対照群と比較して H3K9me3 陽性細胞が有意に多く観察された。他方、扁桃体 BLA 領域では群間に H3K9me3 陽性細胞数の差異は観察されなかった。一方、再固定化を誘導する 3 分間の再エクスポージャー後には海馬 CA1 領域において群間に H3K9me3 陽性細胞数の差異は観察されなかった。従って、海馬では恐怖記憶消去時特異的にヒストン H3 トリメチル化修飾 (H3K9me3) が誘導され、転写が能動的に抑制されていることが示唆された。

## 1-2. 恐怖記憶に対する想起中の海馬光活性化の影響の行動学的解析

ChR2 は青色光照射によりナトリウムイオンの細胞内への流入を導き、その結果膜電位の脱分極が誘導されて活動電位が発生する。アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて  $\alpha$  CaMKII プロモーター制御下で ChR2 を海馬に発現させて (AAV- $\alpha$  CaMKII-ChR2-EYFP), 恐怖記憶想起中の海馬光活性化の影響を解析した。1-1 と同様にトレーニング及び 30 分間の再エクスポージャーを行い、再エクスポージャー開始 5 分後から 25 分間海馬を人為的に活性化させた。この 24 時間後に再度チャンバーにマウスを 5 分間戻し、恐怖反応 (すくみ反応) を示した時間の長さを測定した (テスト)。その結果、光照射しなかった対照群では、過去の知見と同様に、再エクスポージャー中にすくみ反応が徐々に低下し、さらに、テストにおいても低いすくみ反応が維持されていたことから、消去学習が行われ、この記憶消去が維持されたと判断された。一方、ChR2 群でも、再エクスポージャー中に光照射を行っても対照群と同様にすくみ反応の低下が観察され、光照射の影響は観察されなかった。しかし、テストでは ChR2 群は対照群よりも有意に高いすくみ反応を示し、再エクスポージャー中の海馬活性化による記憶消去の維持の阻害が観察された。従って、記憶想起中の海馬活性化は恐怖記憶消去を阻害し、その結果、恐怖記憶が維持されることが示された。また、前脳特異的に ChR2 を発現させたトランスジェニックマウスを用いた解析においても、同様の結果が観察された。

## 1-3. 恐怖記憶想起中の海馬光活性化が誘導する分子動態の解析

想起中の海馬光活性化により恐怖記憶の消去が阻害される分子機構の解析を目的に、1-1 で同定した転写抑制の分子マーカーである H3K9me3, 及び記憶固定化, 再固定化及び消去時の転写活性化の分子マーカーであるリン酸化型 CREB (pCREB) の陽性細胞を解析した。1-2 と同様に再エクスポージャーを行い、海馬の光活性化を行った (ChR2 Shock + 群)。また、対照群として、ChR2 を発現させずに光操作を施した野生型マウス群 (Wild Type; WT Shock + 群), 電気ショックを与えずに恐怖記憶を形成させなかったものの、光操作を行った二群 (WT Shock - 群, ChR2 Shock - 群) をそれぞれ設けた。その結果、1-1 の結果と同様に、WT Shock + 群では WT Shock - 群と比較して H3K9me3 陽性細胞数が有意に多く観察され、消去誘導に伴う H3K9me3 レベルの増加が観察された。一方、ChR2 両群では WT 両群と比較して pCREB 陽性細胞数が有意に多く観察され、海馬の光活性化により恐怖記憶の有無に関わらず CREB リン酸化が誘導されることが明らかとなった。しかし、ChR2 Shock + 群における H3K9me3 陽性細胞数は他の対照群と同程度であり、WT Shock + 群よりも有意に少なかった。以上のように、消去誘導時に海馬の光活性化が恐怖記憶消去を阻害することに相関して、H3 のトリメチル化修飾による転写抑制も解除されることが示唆された。

#### 1-4. 恐怖記憶に対する想起中の海馬記憶エンGRAM光活性化の影響の解析

続いて、c-Fos:tTA タグシステムを用いて、海馬の恐怖記憶エンGRAMを特異的に活性化した影響を解析することで、恐怖記憶消去に対する恐怖記憶エンGRAMの役割の解析を試みた。このシステムでは、初期応答遺伝子 c-fos のプロモーター制御下でテトラサイクリン依存性転写因子 (tTA) を発現誘導し、tTA 依存性プロモーター制御下で ChR2 を発現誘導する。まず、ドキシサイクリン (Dox) を添加した飼料を与えて (Dox ON), tTA による転写活性化を阻害した c-Fos:tTA マウス海馬に、tTA 制御により ChR2 を発現する AAV (AAV-TRE-ChR2-EYFP) を感染させた。5 日間連続して光刺激を与えた後 (光馴化操作), 通常飼料に戻した (Dox OFF)。その後、1-1 と同様にトレーニングを行い、恐怖条件づけ時に c-fos 発現が誘導される神経細胞, すなわち、記憶エンGRAMを ChR2 でラベルした。その後再び Dox 添加飼料を与え (Dox ON), トレーニング 48 時間後に 30 分間の再エクスポージャーを行い、1-2 と同様に再エクスポージャー開始 5 分後から光照射を行った。その結果、これまでの結果に一致して、再エクスポージャー時に、対照群ではすくみ反応低下が観察され、消去が誘導された。これに対して、ChR2 群では 1-2 とは異なり、光照射中にすくみ反応が高く維持され、さらに、テストでも高いすくみ反応が観察された。従って、消去誘導中の海馬恐怖記憶エンGRAMの活性化により恐怖記憶消去の誘導と維持が阻害されることが示され、恐怖記憶エンGRAMの不活性化を介して恐怖記憶消去が誘導されることが示唆された。

#### 1-5. 考察と結論

恐怖記憶消去時に海馬ではヒストン H3 のトリメチル化を介する転写抑制が誘導され、遺伝子発現が能動的に不活性化されることが初めて示唆された。さらに、消去誘導時に海馬を活性化させると、このヒストン H3 修飾と消去が共に阻害されることが示された。重要な点として、想起中の海馬の恐怖記憶エンGRAMの活性化により恐怖記憶消去の誘導と維持が阻害されることが初めて明らかにされ、想起中の海馬恐怖記憶エンGRAMの不活性化が消去誘導に必要とされることが示唆された。

### 2. 海馬光不活性化による想起後の恐怖記憶に対する海馬の役割の解析

1 の結果から、想起中の海馬不活性化が恐怖記憶の消去あるいは喪失を導くことが予想されたため、2 では恐怖記憶想起中に海馬を不活性化した影響を解析した。

#### 2-1. 恐怖記憶に対する想起中の海馬光不活性化の影響の行動学的解析

ArchT は緑色光照射によりプロトンの細胞外への流出を導き、その結果、膜電位が過分極状態となり、神経細胞の活性が抑制される。AAV を用いて  $\alpha$  CaMKII プロモーター制御下で ArchT を海馬に発現させて (AAV- $\alpha$  CaMKII-ArchT-GFP), 恐怖記憶想起中の海馬光不活性化の影響を解析した。1-2 と同様にトレーニングを行い、24 時間後に 6 分間チャン

バーに戻し（再エクスポージャー）、さらにこの 24 時間後に再度チャンバーに戻して（テスト）、それぞれすくみ反応を計測した。対照群では、再エクスポージャーとテストにおいて高いすくみ反応を示し、恐怖記憶想起とその維持が観察された。一方、ArchT 群では、再エクスポージャーの開始直前から終了まで緑色光照射により海馬を不活性化させた場合、対照群に比較して照射中のすくみ反応は有意に低くなり、恐怖記憶想起の阻害が観察された。しかし、テストでは対照群と同程度のすくみ反応が観察された。また、再エクスポージャー終了直後から 3 分間光照射することで、想起後に海馬を不活性化させてもテストにおけるすくみ反応に影響は観察されなかった。

続いて、再エクスポージャーの後半の 3 分間のみ光照射を行った場合、ArchT 群では光照射時のすくみ反応が対照群と比較して有意に低くなり、記憶想起の阻害が観察された。興味深いことに、テストにおいても、依然として、ArchT 群では対照群に比較して有意に低いすくみ反応が観察された。さらに、30 日後に 2 回目のテスト（テスト 2）を行った場合にも、ArchT 群では対照群に比較して依然として低いすくみ反応が観察され、消去誘導後約 1 ヶ月で観察される恐怖記憶の自然回復は観察されなかった。以上の結果から、想起中の海馬不活性化による永続的なすくみ反応の低下は消去誘導のためではなく、恐怖記憶が喪失されたためと結論した。また、前脳特異的に ArchT を発現させたトランスジェニックマウスを用いた解析においても、同様の結果が観察された。

## 2-2. 恐怖記憶想起中の海馬光不活性化が誘導する分子動態の解析

想起中の海馬不活性化により恐怖記憶の喪失が誘導されるメカニズムを解析することを目的に、pCREB レベルを解析した。2-1 と同様に再エクスポージャーを行い、後半 3 分間海馬に光照射を行った（ArchT Shock +群）。1-3 と同様に対照群を設けた（WT Shock +群、WT Shock -群、ArchT Shock -群）。その結果、WT Shock +群では他の群と比較して pCREB 陽性細胞数が有意に多く観察されたのに対して、ArchT Shock +群では pCREB 陽性細胞数の増加は観察されなかった。従って、想起中の海馬不活性化により、CREB 活性化が阻害され、その結果、恐怖記憶の再固定化が阻害されて、恐怖記憶の喪失が導かれたことが示唆された。

## 2-3. 恐怖記憶に対する想起中の海馬記憶エンGRAM光不活性化の影響の解析

恐怖記憶制御に対する恐怖記憶エンGRAMの役割を解析するため、海馬記憶エンGRAMを特異的に不活性化した影響を解析した。1-4 と同様に、c-Fos:tTA マウスを用いて、トレーニング時に恐怖記憶エンGRAM細胞を ArchT でラベルした。6 分間の再エクスポージャーの後半 3 分間光照射を行った結果、2-1 と同様に、ArchT 群では光照射中のすくみ反応が有意に低下し、さらに、24 時間後のテスト、30 日後のテストにおいても依然として低いすくみ反応が観察された。従って、想起中の海馬記憶エンGRAM不活性化が恐怖記憶の喪失を導くことが示唆された。

## 2-4. 恐怖記憶に対する想起中の海馬神経ネットワーク光不活性化の影響の解析

恐怖記憶想起中の海馬不活性化が恐怖記憶喪失を導く機構を回路レベルで解析するため、恐怖記憶制御に対する海馬からの出力回路の役割を解析した。まず、AAV を用いて海馬 CA1 ニューロンに GFP を発現させて、海馬からの出力先を解析した結果、過去の知見に一致して、海馬 CA1 は外側中隔核と嗅内皮質に投射することが認められた。恐怖記憶制御に対する海馬→外側中隔核回路と海馬→嗅内皮質回路の役割を解析するため、AAV- $\alpha$ CaMKII-ArchT-GFP により海馬に ArchT を発現させて、2-1 と同様に、再エクスポージャーの後半 3 分間海馬からの外側中隔核あるいは嗅内皮質への投射経路をそれぞれ光不活性化させた影響を解析した。外側中隔核への投射を不活性化させた結果、ArchT 群では、2-1 と同様に、光照射中のすくみ反応が有意に低下し、さらに、24 時間後のテストでも有意に低いすくみ反応が観察された。一方、嗅内皮質への投射を不活性化させた結果、ArchT 群では光照射中のすくみ反応に影響は観察されなかったが、テストでは有意に低いすくみ反応が観察された。以上より、想起後の恐怖記憶維持に対する海馬→外側中隔核回路及び海馬→嗅内皮質回路の重要性が示され、これら回路の役割の差異も示唆された。

## 2-5. 結論及び考察

想起時に海馬あるいは海馬記憶エンGRAMを光遺伝学的に不活性化させると恐怖記憶想起が阻害され、しかも、恐怖記憶が喪失されることが示唆された。特に、この恐怖記憶喪失に、海馬→外側中隔核回路が重要であることが示唆された。重要な点として、想起時の海馬不活性化により CREB 活性化が阻害されたことから、本研究における海馬不活性化は恐怖記憶の再固定化を阻害したことが示唆された。

## 3. 恐怖記憶再固定化と消去制御に対する海馬カルパインの役割の解析

カルパインは  $\text{Ca}^{2+}$  依存性システインプロテアーゼであり、特異的アミノ酸配列を認識して切断することで、NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluN2B などの記憶制御因子群の機能を変化させる。カルパイン 1 と 2 を神経細胞特異的に欠損させたマウスでは、記憶形成の細胞モデルである長期増強の障害が認められる。しかし、記憶制御に対するカルパインの役割は不明である。そこで、恐怖記憶再固定化と消去の分子機構を明らかにするため、カルパイン阻害剤 (ALLN) を海馬に微量注入することで再固定化と消去に対する海馬カルパインの役割を解析した。1-1 と同様にトレーニングを行った。この 24 時間後に 3 あるいは 30 分間の再エクスポージャーを行い、その直後に ALLN (2  $\mu\text{g}$ ) を海馬に注入した。3 分間の再エクスポージャーの 24 時間後のテストでは、ALLN を投与された群は対照群に比較して有意なすくみ反応の低下を示し、再固定化が阻害されたことが明らかとなった。一方、30 分間の再エクスポージャーの場合には ALLN 投与による恐怖記憶消去に対する影響は認められなかった。以上より、海馬カルパインの活性化が、恐怖条件付け文脈記憶の再固定化

に必要とされることが明らかとなった。

#### 4. 総 括

本研究の光遺伝学的解析から、想起中の海馬の恐怖記憶エンングラムの活性化は恐怖記憶の消去を阻害し、一方、この不活性化は恐怖記憶の喪失を導いた。これらの結果から、海馬の記憶エンングラム制御が想起後の恐怖記憶の再固定化と消去に重要な役割を果たすことが示された。従って、想起時の海馬の恐怖記憶エンングラムの活性調節を介して再固定化あるいは消去を誘導するかが決定される恐怖記憶アップデート制御機構の存在が示唆された。また、恐怖記憶想起中の短時間（3 分間）の海馬不活性化により恐怖記憶の喪失が導かれる原理を利用することで、PE 療法を短縮する方法開発に貢献できることが期待された。

#### 審 査 報 告 概 要

本研究では、光遺伝学的手法を用いて海馬の恐怖記憶エンングラム(痕跡)の活性を制御することで、想起後の恐怖記憶制御に対する海馬の役割を解析した。光作動性イオンチャネルを海馬に発現させ、恐怖記憶想起中に海馬を不活性化すると、その後恐怖記憶が減弱すること、一方、消去を誘導する長時間の想起中に海馬を活性化すると、消去が阻害され恐怖記憶が維持されることが示された。さらに、c-fos タグシステムを用いて想起中のエンングラム細胞活性制御の影響を解析した結果、先の結果と同様に、記憶エンングラム不活性化により恐怖記憶の減弱、一方、記憶エンングラム活性化により恐怖記憶の増強が観察された。以上より、想起中の海馬の恐怖記憶エンングラムの活性調節を介して再固定化あるいは消去を誘導するかが決定される、恐怖記憶アップデート機構の実態が示された。主査および副査から審査報告がなされ、専攻内可否を審議した。その結果、学位請求者の経歴や学術業績が学位記申請の要項を満たしていること、外国語を含む最終試験に合格していること、学位請求論文の研究内容や発表会での質疑応答の内容が十分であることが認められた。よって、審査員一同は博士（バイオサイエンス）の学位を授与する価値があると判断した。